

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/09193 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Februar 1999 (25.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02255 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1998 (05.08.98) (30) Prioritätsdaten: 197 35 593.5 15. August 1997 (15.08.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HEPAVEC AG FÜR GENTHERAPIE [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFMANN, Christian [DE/DE]; Einsteinstrasse 26, D-10409 Berlin (DE). STRAUSS, Michael [DE/DE]; Charlottenstrasse 17, D-13156 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Belin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: COAT-PROTEIN-MODIFIED BACULOVIRUS VECTOR FOR GENE THERAPY (54) Bezeichnung: HÜLLPROTEIN-MODIFIZIERTER BACULOVIRUS-VEKTOR FÜR DIE GENTHERAPIE (57) Abstract <p>A coat-protein-modified baculovirus vector for gene therapy is disclosed with applications in medicine, biotechnology and genetic engineering. The object of the invention is the construction of a baculovirus vector with a modified viral coat which makes it highly stable in blood, so that the vector can transfer and establish therapeutic genes of any size with high specificity and effectiveness into mammal cells. The vector should be useful for the gene therapy of humans. The disclosed vector consists of an insect virus, preferably a representative of the baculovirus family or a nuclear polyhedrosis virus, which contains modified virus coat proteins, a therapeutic DNA sequence, a promoter suitable for gene expression, and if required an establishing sequence.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft einen Hüllprotein-modifizierten Baculovirus-Vektor für die Gentherapie; Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Biotechnologie und die Gentechnik. Ziel der Erfindung ist die Konstruktion eines Baculovirus-Vektors, der durch Veränderung der Virushülle eine hohe Stabilität in Blut besitzt und therapeutische Gene unabhängig von ihrer Größe hochspezifisch und effektiv in Säugerzellen transferieren und etablieren kann. Der Vektor soll für die Gentherapie beim Menschen einsetzbar sein. Der erfindungsgemäße Vektor besteht aus einem Insektenvirus, vorzugsweise einem Vertreter der Baculoviren oder einem nuklearen Polyhedrosis-Virus, welches die Komponenten: modifizierte Virus-Hüllproteine, eine therapeutische DNA-Sequenz, einen für die Genexpression geeigneten Promoter und ggf. eine Etablierungssequenz enthält.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Hüllprotein-modifizierter Baculovirus-Vektor für die Gentherapie

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Hüllprotein-modifizierten Baculovirus-Vektor für die Gentherapie; Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Biotechnologie und die Gentechnik.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Methoden und Vektoren für die Gentherapie entwickelt worden (Übersicht in Mulligan/1993/Science 260, 926). Dabei werden viele Vektoren, vor allem solche, die von Retroviren oder Adenoviren abgeleitet sind, favorisiert. Beide Virus-Vektortypen sind relativ breit anwendbar, wobei retrovirale Vektoren nur bei teilungsfähigen Zellen effektiv sind und Adenoviren auch bei ruhenden Zellen funktionieren. Beide Vektortypen sind zwar für die Genübertragung in Leberzellen (Hepatozyten) in vitro geeignet, können aber für eine in vivo Anwendung zur Gentherapie beim Menschen kaum in Betracht gezogen werden. Während für die Anwendung retroviraler Vektoren eine Leberteilresektion zur Stimulierung von Zellteilung (Regeneration) erforderlich wird, ist der adenovirale Gentransfer nicht sehr stabil (keine Integration in das Genom).

Alternative Vektoren mit potentieller Anwendbarkeit für den Lebergentransfer basieren auf Liposomen oder auch auf Multikomponenten-Partikeln mit Proteindomänen, die spezifisch an bestimmte Rezeptoren der Leber (z.B. Asialoglykoprotein-Rezeptor) binden und durch deren Internalisierung in die Zelle aufgenommen werden können (Übersicht in: Versland et al/1992/ Seminars in Liver Disease 12, 332). Ein wesentlicher Nachteil dieser Vektoren besteht in der Aufnahme über den endozytotischen Weg der zu einer Degradation eines großen Teils der Vektoren und ihrer DNA in den Endosomen führt, so daß nur wenig funktionsfähige DNA den Zellkern erreichen kann.

Eine Lösung für dieses Problem wurde zwar für die in vitro Anwendung gefunden; diese ist aber nicht auf die Situation in

vivo (am Patienten) anwendbar. Sie basiert auf der gleichzeitigen Infektion der Zielzellen mit Adenovirus, was zur Auflösung der Endosomen und Freisetzung von Vektor (DNA) führt (Curiel, D.T., Agrawal, S., Wagner, E. und Cotten, M./1991, PNAS 88, 8850-8854).

In DE 44 07 859 wurde ein Baculovirus-Vektor vorgeschlagen, der therapeutische Gene hochspezifisch und effektiv in Leberzellen transferieren kann. Baculoviren gehören zu einer Familie großer DNA-Viren, deren Wirtsspektrum natürlicherweise ausschließlich auf Arthropoden beschränkt ist. Ihr Genom (80kbp-200kbp) ist in flexible Nukleokapside verpackt, die die Insertion großer Mengen Fremd-DNA ermöglicht.

Die entscheidende Voraussetzung für den baculoviralen Gentransfer in Säugerzellen ist die Insertion einer in Säugerzellen funktionsfähigen Expressionskassette. Damit wurde eine wichtige Voraussetzung für eine Therapie genetischer Erkrankungen der Leber geschaffen.

Die Effektivität des Gentransfers in Hepatozyten durch Baculovirus-Vektoren wird allerdings durch Serumkomponenten reduziert (Sandig et al., 1996; Hum. Gen. Ther. 7:1937-1945). Diese Reduktion des Gentransfers ist vermutlich auf die Inaktivierung des Baculovirus-Vektors durch das Komplementsystem zurückzuführen und schränkt seinen therapeutischen Einsatz in vivo erheblich ein.

Ziel dieser Erfindung ist die Konstruktion eines Baculovirus-Vektors, der durch Modifikation der Virushülle der Inaktivierung durch Serumkomponenten entkommt und therapeutische Gene hochspezifisch und effektiv in Leberzellen in vivo transferiert.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1 und 12 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Die dieser Erfindung zugrunde liegenden Technologien zur Generation Hüllprotein-modifizierter Baculovirus-Vektoren resultieren in einem breiten Spektrum neuartiger Vektoren, die durch Mutation und Selektion oder gezielte Modifizierung der Baculovirushülle (Insertion von Rezeptorliganden) auch eine Veränderung des Wirtsspektrums zum spezifischen

"Targeting" von Nicht-Leberzellen ermöglichen. Das gesamte Spektrum an Baculovirus-Vektoren, das im Rahmen dieser Erfindung generiert wurde, soll eine Lösung für die Vielfalt von Ansprüchen an einen Vektor für die Gentherapie darstellen und für entsprechende Anwendungen am Menschen einsetzbar sein.

Als therapeutische DNA-Sequenz für den erfindungsgemäßen Vektor wird die cDNA eines Gens verwendet, das bei der zu behandelnden Krankheit defekt ist, d.h. fehlt oder durch Mutation verändert ist. Man kann auch einen Teil einer genomischen Sequenz einsetzen, die eine Mutation im Zielgen überspannt und mit dieser homolog rekombinieren kann.

Als Promotoren dienen in erster Linie starke virale Promotoren, vorzugsweise der sehr frühe Promoter des Cytomegalievirus (CMV). Ebenfalls in Betracht kommen zelltyp-spezifische Promotoren.

Die Etablierungssequenz hat die Aufgabe, für eine Stabilisierung des Vektors in der Zelle ohne Integration in das Genom zu sorgen. Sie wird besonders in den Fällen verwendet, wenn eine Langzeitexpression erforderlich ist. Bevorzugte Etablierungssequenzen gemäß der Erfindung sind virale Kernetablierungssequenzen, wie die des Epstein-Barr-Virus, oder autonome Replikationssequenzen aus dem Säugergenom.

Die Herstellung der neuen Vektoren erfolgt in den folgenden wesentlichen Schritten:

I. Methode durch Mutagenese und Selektion (Anspruch 2, Ausführungsbeispiel 1):

- Mutagenisierung von Baculoviren durch Bromdesoxyuridin
- Inkubation der mutagenisierten Viren mit Serum
- Isolierung einzelner Virusklone durch Plaque-assay auf Insektenzellen
- Screening auf Serumresistenz und Infektionsspektrum

II. Methode durch Insertion modifizierter Hüllproteine (Anspruch 3-6, Ausführungsbeispiel 2):

- Klonierung der Sequenz eines N-terminal modifizierten Baculovirus-Hüllproteins (gp64) unter Kontrolle eines baculoviralen Promoters in einem Rekombinationsvektor

a)

- Integration des Konstrukts in den Rekombinationsvektor, der die therapeutischen DNA-Sequenz zusammen mit dem Promoter enthält

- ggf. Einfügung einer Etablierungssequenz vor oder nach der Klonierung

- Transfektion des erhaltenen Konstrukts gemeinsam mit der DNA eines Insektenvirus in Insektenzellen und

- Gewinnung des in den Insektenzellen verpackten Vektors aus dem Überstand der Insektenzellkultur.

b)

- Stabile Integration des Konstrukts in die Virusverpackungszelle

- Gewinnung des Hüllprotein-modifizierten Baculovirus-Vektors durch Vermehrung eines unmodifizierten Vektors mit therapeutischer Expressionskassette in Insektenzellen

Durch diese Erfindung wird ein neuartiger Vektor für den Gentransfer geschaffen, der gegenüber den bisher entwickelten Virusvektoren (Retroviren, Adenoviren und unmodifizierte Baculoviren) erhebliche Vorteile bietet. Dazu gehören die Stabilität in Blut und Serum, die Leberspezifität bzw. freie Variierung des Zelltargetings, die fast unbegrenzte Möglichkeit, Fremd-DNA einzubauen, die Infektion nicht teilungsfähiger Zellen, die fehlende Cytotoxizität und die einfache Generierung hochtitriger rekombinanter Viren.

Die Hüllprotein-modifizierten Baculovirus-Vektoren ermöglichen je nach Modifikation, ein gewünschtes Gen in das betroffene Organ eines Patienten einzuführen und seinen Weg zum Funktionsort optimal zu gestalten. Die Applikation des Vektors kann dabei lokal oder systemisch erfolgen. Dadurch wird eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie genetischer und maligner Erkrankungen des Menschen geschaffen.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

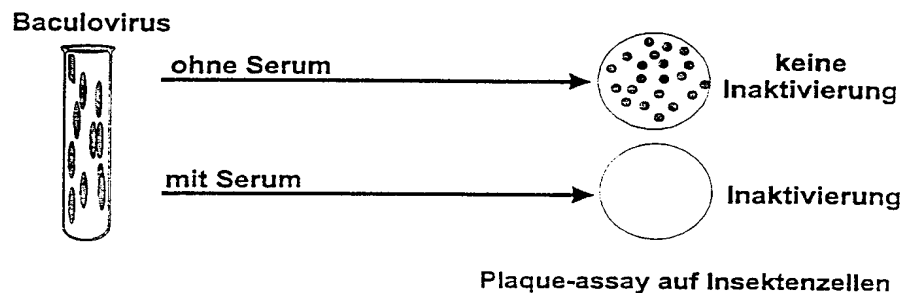
Ausführungsbeispiel 1:

I. Methode durch Mutagenese und Selektion

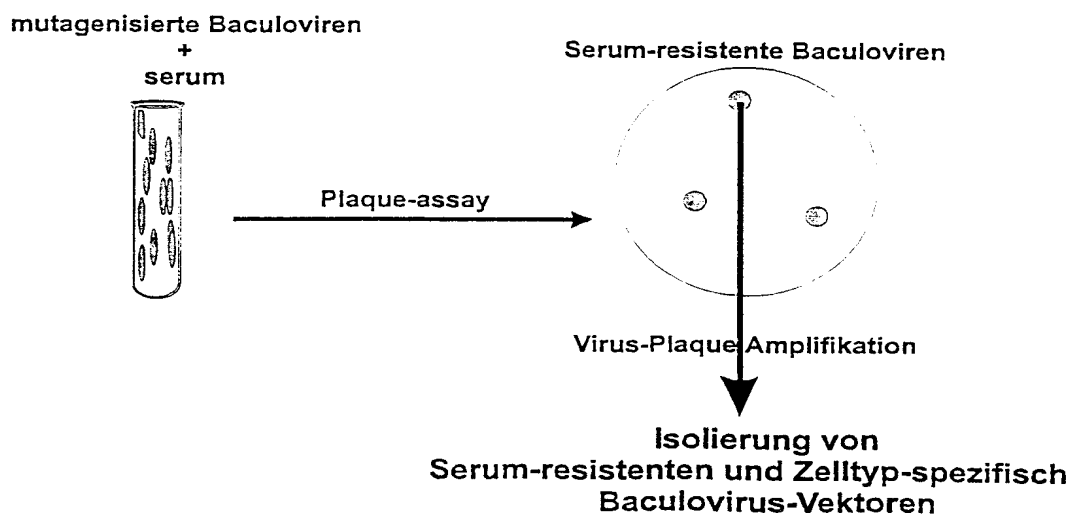
Der Gentransfer durch Baculoviren wird durch Serum reduziert (Stand der Technik).

Neue Baculovirus-Vektoren wurden durch Mutagenisierung von Baculoviren (10^9 pfu) durch Bromdesoxyuridin ($50 \mu\text{g/ml}$) in Insektenzellen hergestellt. $10 \mu\text{l}$ der Viren wurden mit $90 \mu\text{l}$ Serum 30 min bei 37°C inkubiert. Einzelne Virusklone wurden durch Plaque-assay auf Insektenzellen in bekannter Weise isoliert. Einzelne Virusplaques wurden bzgl. ihrer Infektionsfähigkeit in Leberzellen nach erneuter Serumbehandlung getestet. Das effektivste Virus erhielt den Namen Baculo-Ser^r. Viren mit verändertem Wirtsspektrum wurden ebenfalls isoliert.

Stand der Technik



Neue Baculovirus-Vektoren

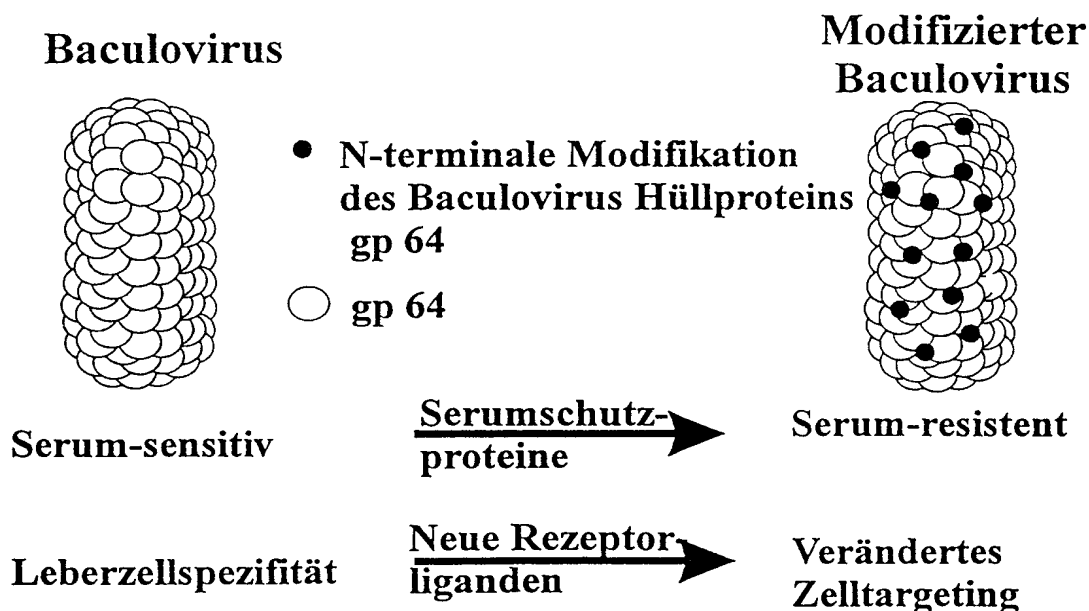


Ausführungsbeispiel 2:

Es wird eine Sequenz für ein N-terminal modifiziertes Baculovirus-Hüllproteins (gp64) unter Kontrolle eines baculoviralen Promoters in einem Rekombinationsvektor in bekannter Weise kloniert. Die Modifizierung wird durch Insertion der DNA-Sequenz für Aminosäuren 1-320 des Komplement-Schutzproteins "decay accelerating factor (DAF)" zwischen die Signalsequenz und die Sequenz des Baculovirus-Hüllproteins gp64 auf DNA-Ebene erreicht. Dieses Konstrukt wird entweder in den Rekombinationsvektor, der die therapeutischen DNA-Sequenzen zusammen mit dem Promoter enthält, kloniert oder stabil in die Virusverpackungszelle integriert. Bei der Virusproduktion wird das modifizierte Hüllprotein in die Hülle des Baculovirus-Vektors inseriert und vermittelt dadurch:

- Serum-resistenz durch Insertion von Komplement-Schutzproteinen oder Glykosyltransferasen laut Anspruch 3 und 5.
- Zelltyp-spezifische Infektion außerhalb der bereits nachgewiesenen Leberzellspezifität durch Insertion spezifischer Rezeptorliganden laut Anspruch 4.

Genetische Modifizierung des Baculovirus-Hüllproteins gp 64



Patentansprüche

1. Vektor für die Gentherapie, bestehend aus
-einem Baculovirus,
welches die Komponenten
- modifizierte Virus-Hüllproteine
- eine therapeutische DNA-Sequenz,
- einen Promoter für die Expression in Säugerzellen,
- und ggf. eine Etablierungssequenz enthält.
2. Vektor nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierung der Virus-Hüllproteine durch Mutation und Selektion auf Serumresistenz bzw. verändertes Wirtsspektrum erfolgt.
3. Vektor nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierung der Virus-Hüllproteine durch spezifische Insertion von Komplement-Schutzproteinen, vorzugsweise DAF (decay-accelerating factor, CD55), MCP (membrane cofactor protein, CD46), CD 59 (protectin) oder aus Kombinationen dieser, erfolgt.
4. Vektor nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierung der Hüllproteine durch einen spezifischen Rezeptorliganden, vorzugsweise Heregulin, Steel Faktor, CD4 oder Transferrin erfolgt.
5. Vektor nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierung der Virus-Hüllproteine durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erfolgt, vorzugsweise vermittelt durch Glykosyltransferasen.
6. Vektor nach Anspruch 1-5 dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierung der Virus-Hüllproteine durch entsprechend eingebrachte DNA-Sequenzen in das Virusgenom vermittelt wird oder durch stabiles Einbringen der notwendigen DNA-Sequenzen in die virusverpackende Zelllinie erreicht wird.

7. Vektor nach Anspruch 1-6 dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutische DNA-Sequenz die cDNA des/der Gens/Gene verwendet werden, die bei der zu behandelten Krankheit defekt sind.
8. Vektor nach Anspruch 1-6 dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutische DNA-Sequenz die genomische DNA-Sequenz des/der Gens/Gene verwendet werden, die bei der zu behandelten Krankheit defekt sind.
9. Vektor nach Anspruch 1-6 dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutische DNA-Sequenz ein Teil einer genomischen Sequenz verwendet wird, die eine Mutation im Zielgen überspannt und eine Korrektur des Gendefekts mittels homologer Rekombination bewirkt.
10. Vektor nach Anspruch 1-9 dadurch gekennzeichnet, daß als Promoter für die Expression in Säugerzellen ein starker viraler oder ein zelltyp-spezifischer Promoter verwendet wird.
11. Vektor nach Anspruch 1-10 dadurch gekennzeichnet, daß als Etablierungssequenz eine virale Kernetablierungssequenz, wie die des Epstein-Barr Virus, oder eine autonome Replikationssequenz verwendet wird.
12. Verfahren zur Herstellung des Vektors nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß die Hüllproteine von Baculovirus durch a) Mutation und Selektion auf Serumresistenz bzw. verändertes Wirtsspektrum oder durch Insertion der für die Modifikation notwendigen DNA-Sequenzen in b) das Baculovirus-Genom oder c) in die Vektor-produzierenden Insektenzelle, verändert werden, die therapeutische DNA-Sequenz zusammen mit dem Promoter und ggf. einer Etablierungssequenz ebenfalls in das Baculovirusgenom inseriert und der Vektor aus dem Überstand der Insektenzellkultur gewonnen wird.

13. Verfahren zur Anwendung des Vektors nach Anspruch 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor konfektioniert und einem Patienten systemisch oder lokal zur Therapie der genetisch bedingten Erkrankung verabreicht wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/02255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANDIG V ET AL: "GENE TRANSFER INTO HEPATOCYTES AND HUMAN TISSUE BY BACULOVIRUS VECTORS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 7, no. 16, 20 October 1996, pages 1937-1945, XP000674903 cited in the application see the whole document ---	1-13
A	DE 44 07 859 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 2 March 1995 cited in the application see the whole document ---	1-13
A	WO 96 09074 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 28 March 1996 see page 47, line 24 - line 29 ---	1-13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 1999

Date of mailing of the international search report

25/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/02255

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>BARSOUM J ET AL: "Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, no. 17, 20 November 1997, pages 2011-2018, XP002089846</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	1,6,10
P,A	<p>WO 97 43403 A (THOMPSON BOYCE PLANT RES)</p> <p>20 November 1997</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 98/02255

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Observation: Although Claim 13 relates to a method for treating the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the vector.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/DE 98/02255

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4407859 C	02-03-1995	AU 1889495 A WO 9523866 A EP 0746624 A JP 10501402 T	18-09-1995 08-09-1995 11-12-1996 10-02-1998
WO 9609074 A	28-03-1996	US 5731182 A AU 3675095 A CA 2200835 A CN 1172435 A EP 0785803 A JP 10506530 T ZA 9507797 A	24-03-1998 09-04-1996 28-03-1996 04-02-1998 30-07-1997 30-06-1998 08-07-1996
WO 9743403 A	20-11-1997	US 5750383 A	12-05-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02255

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/86 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SANDIG V ET AL: "GENE TRANSFER INTO HEPATOCYTES AND HUMAN TISSUE BY BACULOVIRUS VECTORS" HUMAN GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 16, 20. Oktober 1996, Seiten 1937-1945, XP000674903 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-13
A	DE 44 07 859 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 2. März 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-13
A	WO 96 09074 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 28. März 1996 siehe Seite 47, Zeile 24 - Zeile 29 --- -/-	1-13



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/01/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02255

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>BARSOUM J ET AL: "Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, Bd. 8, Nr. 17, 20. November 1997, Seiten 2011-2018, XP002089846 siehe das ganze Dokument -----</p>	1,6,10
P,A	<p>WO 97 43403 A (THOMPSON BOYCE PLANT RES) 20. November 1997 siehe das ganze Dokument -----</p>	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/ 02255

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl Anspruch 13
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Vektor.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02255

-

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4407859 C	02-03-1995	AU 1889495 A	18-09-1995
		WO 9523866 A	08-09-1995
		EP 0746624 A	11-12-1996
		JP 10501402 T	10-02-1998
WO 9609074 A	28-03-1996	US 5731182 A	24-03-1998
		AU 3675095 A	09-04-1996
		CA 2200835 A	28-03-1996
		CN 1172435 A	04-02-1998
		EP 0785803 A	30-07-1997
		JP 10506530 T	30-06-1998
		ZA 9507797 A	08-07-1996
WO 9743403 A	20-11-1997	US 5750383 A	12-05-1998